

BS

## ACCELERATOR FOR AMELIORATION AND REGENERATION OF TRANSPLANTED HEPATIC FUNCTION

Patent Number: JP10194986  
Publication date: 1998-07-28  
Inventor(s): SUGIMACHI KEIZO; UCHIYAMA HIDEAKI  
Applicant(s): SNOW BRAND MILK PROD CO LTD  
Requested Patent: ☐ JP10194986

Application Number: JP19970168177 19970610

Priority Number(s):

IPC Classification: A61K38/22 ; A61K38/00

EC Classification:

Equivalents:

### Abstract

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To obtain the subject medicine which accelerates the functional amelioration of transplanted hepatic tissues and its regeneration and can recover the hepatic function in the early stage after operation of liver transplantation by using a hepatocyte proliferation factor, particularly by combining the hepatocyte proliferation factor with an immunosuppressant in combination.

**SOLUTION:** This medicine contains a hepatocyte proliferation factor or both of the hepatocyte proliferation factor and an immunosuppressant. As the hepatocyte proliferation factor, TCF-11 is preferable, particularly when the TCF-11 and the immunosuppressant are used in combination, the activity is remarkably enhanced. The TCF-11 is a well-known protein desired from human fibroblast and is obtained by the method of purifying it after concentrating the culture medium of human fibroblast and allowing it to absorb into an ion exchanger or by means of genetic engineering. The TCF-11 can be parenterally administrated as an injection and the preparation containing 0.6-600mg/day/adult, preferably 6-60mg/day/adult, as the purified TCF-11 is administrated to patients before liver-transplanting. When the TCF-11 is used in combination with the immunosuppressant (e.g. tacrolimus), 0.1-100mg/day/adult is administrated.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-194986

(43) 公開日 平成10年(1998) 7月28日

(51) Int.Cl.<sup>6</sup>A 61 K 38/22  
38/00

識別記号

ACS

F 1

A 61 K 37/24  
37/02

ACS

審査請求 未請求 請求項の数 3 F D (全 6 頁)

(21) 出願番号	特願平9-168177	(71) 出願人	000006699 雪印乳業株式会社 北海道札幌市東区苗穂町6丁目1番1号
(22) 出願日	平成9年(1997) 6月10日	(72) 発明者	杉町 圭蔵 福岡県福岡市東区香住ヶ丘3-3-20
(31) 優先権主張番号	特願平8-170555	(72) 発明者	内山 秀昭 京都府京都市中京区寺町通御池上ル上本能 寺前町470 バインオークメッセ203
(32) 優先日	平8(1996) 6月10日	(74) 代理人	弁理士 藤野 清也
(33) 優先権主張国	日本 (J P)		
(31) 優先権主張番号	特願平8-315532		
(32) 優先日	平8(1996) 11月12日		
(33) 優先権主張国	日本 (J P)		

(54) 【発明の名称】 移植肝機能改善・再生促進剤

(57) 【要約】

【課題】 新規な移植肝の機能改善及び再生促進剤の提供。

【解決手段】 肝細胞増殖因子あるいは肝細胞増殖因子と免疫抑制剤とを有効成分とする移植肝機能改善・再生促進剤。肝細胞増殖因子としては、T C D-11が好ましい。肝移植前のドナーあるいは肝移植後のレシピエントに非経口的に投与することによって、移植した肝組織の機能改善及び再生が促進され、肝移植手術後の肝機能を早期に回復することができる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 肝細胞増殖因子を有効成分とする移植肝機能改善・再生促進剤。

【請求項2】 肝細胞増殖因子と免疫抑制剤とを併用する移植肝機能改善・再生促進剤。

【請求項3】 肝細胞増殖因子がTCF-IIである、請求項1または2記載の移植肝機能改善・再生促進剤。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、肝細胞増殖因子を有効成分とする移植肝機能改善・再生促進剤に関する。さらに、本発明は、肝細胞増殖因子と免疫抑制剤とを併用する移植肝機能改善・再生促進剤に関する。本発明により、移植した肝組織の機能改善及び再生が促進され、肝移植手術後の肝機能を早期に回復することができる。

## 【0002】

【従来の技術】現在、肝移植は末期肝硬変患者に対する唯一の根本的治療手段である。しかし、脳死肝臓移植においては、深刻なドナー不足の問題がある。この問題に対処する一つの方法として、ドナー肝を二つに分け、二人のレシピエントに移植する方法がある（分割肝移植）。当然ながら、レシピエントには理想肝容積よりも小さな移植片が移植されることになる。小さな移植片は肝の予備能が劣っており、ラットでは理想肝容積の30%が限界とされている。また日本では、脳死肝移植は未だ社会的合意が得られておらず、当面は生体部分肝移植が主に行われていくことが予想される。この生体部分肝移植では、理想肝容積よりも小さな移植片が移植されるケースが多く、ことに成人の生体部分肝移植では当然のことながら、極めて小さな移植片が移植されることになる。脳死ドナーからの分割肝移植及び生体部分肝移植における、移植肝の機能をより早期に改善することが可能となれば、小さな部分肝の移植の施行が可能になると考えられる。しかし、このような部分移植肝の機能を改善する治療法に関しては、今までのところ、実際に臨床応用の可能性が期待できる報告はなかった。

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明者らは上述の状況に鑑み、肝臓移植後の移植肝機能を改善、また再生を促進させる物質を求め鋭意探索の結果、肝細胞増殖因子、特にTCF-IIが、その効果を有することを見出した。さらに、肝細胞増殖因子、特にTCF-IIと免疫抑制剤とを併用することにより、その活性を著しく増強することを見出した。即ち、本発明は、肝細胞増殖因子、特にTCF-IIを有効成分とする移植肝機能改善・再生促進剤、及び肝細胞増殖因子、特にTCF-IIと免疫抑制剤とを併用する移植肝機能改善・再生促進剤を提供することを課題とする。

## 【0004】

【課題を解決するための手段】本発明は、肝細胞増殖因

子を有効成分とする移植肝機能改善・再生促進剤に関する。さらに、本発明は肝細胞増殖因子と免疫抑制剤とを併用する移植肝機能改善・再生促進剤に関する。本発明における肝細胞増殖因子としては、特にTCF-IIが好ましい。本発明により、移植した肝組織の機能改善及び再生が促進され、肝移植手術後の肝機能を早期に回復することができる。

## 【0005】

【発明の実施の形態】本発明の有効成分である肝細胞増殖因子は特に限定されず、特に好ましくはTCF-IIが用いられる。本発明で用いられるTCF-IIは、ヒト線維芽細胞由来の公知の蛋白質であり、ヒト線維芽細胞由来のものは下記の特性を有する。

【0006】i) 分子量 (SDS電気泳動法)

非還元下 : 78,000±2,000 又は74,000±2,000

還元下 : 52,000±2,000 (共通バンドA)

30,000±2,000 (バンドB)

26,000±2,000 (バンドC)

ii) 等電点 : 7.4 ~ 8.6

【0007】上記TCF-IIは、ヒト線維芽細胞培養液を濃縮イオン交換体に吸着させ、その溶出液をアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製する方法(WO 90/10651号公報)や、或いは遺伝子工学的的手法(WO 92/01053号公報)によって得ることができる。この時、宿主細胞又は微生物の違いによる糖鎖の異なったものや、糖鎖の結合していないものであっても使用可能である。しかし、糖鎖は生体内の代謝速度に関係しているため、糖鎖の結合しているものを用いることが望ましい。これらの方法により得られたTCF-IIは、通常の単離精製法によってさらに濃縮、精製することができる。例えば、有機溶媒による沈殿法、塩析、ゲル濾過、モノクローナル抗体を用いたアフィニティークロマト、電気泳動法等が挙げられる。モノクローナル抗体を用いたアフィニティークロマトによる精製は、特開平5-97号公報に開示されているモノクローナル抗体を用いて精製することができる。得られた精製TCF-IIは、凍結乾燥或いは凍結保存することができる。その他、TCF-IIと同様の活性を有するものであれば本発明と同様の薬剤として利用可能である。例えば、TCF-II蛋白質と5アミノ酸の違いを有する蛋白質である肝細胞増殖因子(HGF; 特開昭63-22526号)、あるいは精製ScatterFactor (SF; Gherardi and Stocker, Nature, 346, 228(1990))などが挙げられる。

【0008】本発明の移植肝機能改善・再生促進剤は、注射剤として静脈、筋肉内、及び皮下に非経口的に投与することができる。これらの製剤は公知の製剤学的製法に準じ製造され、必要に応じてpH調整剤、緩衝剤、安定化剤等を添加することができる。本発明の製剤は、肝移植後の患者、すなわちレシピエントに投与される。また、本発明の製剤は、肝移植前の患者、すなわちドナー

に肝移植前に予め投与しておいてもよい。このような患者に投与する場合、投与患者の症状の程度、健康状態、年齢、体重等の条件によって異なり、特に限定されないが、成人患者1日当たり精製TCF-IIとして0.6mg~600mg、好ましくは6mg~60mgを含有する製剤を1日1回若しくはそれ以上投与すれば良い。

【0009】さらに、本発明の製剤は、免疫抑制剤と併用することにより、その作用を増強することができる。この時用いられる免疫抑制剤としては、シクロスポリン、ミゾリビン、タクロリムス水和物が用いられ、特に好ましくはタクロリムス水和物が挙げられ、これらの投与量は、肝細胞増殖因子と同様に投与患者の条件によって異なり、特に限定されないが、成人患者1日当たり0.1~100mg程度を投与するとよい。投与は、肝細胞増殖因子と免疫抑制剤とを同時に一剤の形あるいは二剤の形で投与してもよいし、また、それぞれの剤を個別に投与時期を変えて投与してもよい。本発明ではそれらの投与形態を併用という。

【0010】以下の実施例によって本発明をより詳細に説明するが、これらは単に例示したのみであり、これらによって本発明は何ら限定されるものではない。

【0011】

【実施例1】

#### TCF-IIの精製

W090/10651号公報に開示された方法及び東尾らの方法(Higashio, K. et al. B.B.R.C., vol.170, pp397-404 (1990))に準じて細胞を培養し、精製TCF-IIを得た。すなわち、ヒト繊維芽細胞IMR-90(ATCC CCL 186)細胞を5%仔牛血清を含むDMEM培地100mlを入れたローラーボトルに3×10<sup>6</sup>個移植し、0.5~2回転/分の速度で回転させながら7日間培養を続けた。総細胞数が1×10<sup>7</sup>個になったところでトリプシンにより細胞を剥離し細胞をボトル底面に集め、5~9メッシュのセラミック100g(東芝セラミック社)を殺菌して投入し、24時間静置して培養した。その後、上記培養液を500ml加え、培養を継続した。7~10日ごとに培地を全量回収し、新鮮培地を補給した。このようにして2ヵ月間生産を継続し、ローラーボトル一本当たり4リットルの培養液を回収した。このようにして得た培養液当たりの生産量は32u/mlであった。培養液750リットルをメンブランフィルター(MW6000カット;アミコン社)処理によりUF濃縮し、CMセファデックスC-50(ファルマシア社)、ConAセファロース(ファルマシア社)、MonoSカラム(ファルマシア社)、ヘパリンセファロース(ファルマシア社)による4段階のクロマト精製を行い、精製TCF-IIを得た。

【0012】

【実施例2】

#### 遺伝子組換えTCF-IIの生産

W092/01053号公報に開示された方法に従い、TCF-II

遺伝子を組み込んだ細胞を培養し、精製TCF-IIを得た。すなわち、形質転換ナマルワ(Namalwa)細胞を培養し、培養液20リットルを得た。この培養液をCMセファデックスC-50クロマト(ファルマシア社)、ConAセファロースCL-6Bクロマト(ファルマシア社)、MonoSカラム(ファルマシア社)を装着したHPLCの順に処理を行い、約11mgの活性TCF-IIを得た。

【0013】

【実施例3】

#### TCF-II製剤の製造

前記実施例2により得られた遺伝子組換えTCF-IIの、注射剤の製造例を示す。

① TCF-II 20 μg

ヒト血清アルブミン 100 mg

上記組成をpH 7.0の0.01Mリン酸緩衝液(PBS)に溶解し全量を20mlに調製し、滅菌後バイアル瓶に2mlずつ分注したものを凍結乾燥後密封した。

【0014】

② TCF-II 40 μg

ツイーン80 1 mg

ヒト血清アルブミン 100 mg

上記組成を注射用生理食塩水に溶解し全量を20mlに調製し、滅菌後バイアル瓶に2mlずつ分注したものを凍結乾燥後密封した。

【0015】

③ TCF-II 20 μg

ツイーン80 2 mg

ソルビトール 4 g

上記組成をpH 7.0の0.01M PBSに溶解し全量を20mlに調製し、滅菌後バイアル瓶に2mlずつ分注したものを凍結乾燥後密封した。

【0016】

④ TCF-II 40 μg

ツイーン80 1 mg

グリシン 2 g

上記組成を注射用生理食塩水に溶解し全量を20mlに調製し、滅菌後バイアル瓶に2mlずつ分注したものを凍結乾燥後密封した。

【0017】

⑤ TCF-II 40 μg

ツイーン80 1 mg

ソルビトール 2 g

グリシン 1 g

上記組成を注射用生理食塩水に溶解し全量を20mlに調製し、滅菌後バイアル瓶に2mlずつ分注したものを凍結乾燥後密封した。

【0018】

⑥ TCF-II 20 μg

ソルビトール 4 g

ヒト血清アルブミン 50 mg

上記組成をpH7.0の0.01M PBSに溶解し全量を20mlに調製し、滅菌後バイアル瓶に2mlずつ分注したものを凍結乾燥後密封した。

#### 【0019】

㊦ TCF-II 40  $\mu$ g  
グリシン 2 g  
ヒト血清アルブミン 50 mg

上記組成を注射用生理食塩水に溶解し全量を20mlに調製し、滅菌後バイアル瓶に2mlずつ分注したものを凍結乾燥後密封した。

#### 【0020】

㊧ TCF-II 40  $\mu$ g  
ヒト血清アルブミン 50 mg

上記組成をpH7.0の0.01M PBSに溶解し全量を20mlに調製し、滅菌後バイアル瓶に2mlずつ分注したものを凍結乾燥後密封した。

#### 【0021】

##### 【実施例4】

##### 部分肝移植における効果

Lewis系ラット(雄、体重235~312g)の肝臓の左葉及び尾状葉を切除後、UW液(ビラスパン(登録商標)液、藤沢薬品社)に1時間冷蔵保存し、これをドナー肝とした。このドナー肝を、肝臓を全摘出した30匹のレシビエントラット(Lewis系ラット、雄)に同所性に移植した。尚、この時のドナーとレシビエントの体重差は10g以内とした。このレシビエントラットを各15匹ずつ、TCF-II投与及び非投与の2群に分けた。TCF-II投与群は移植直後から12時間毎に実施例2で得られたTCF-II 125 $\mu$ gを生理食塩水中に懸濁し、これを静注した。術後1、3、7日目に犠牲死させ、肝重量の測定及び血清の採取を行った。採取した血清は、常法により総蛋白濃度及びアルブミン濃度の測定を行った。結果を図1~3に示す。

【0022】この結果、TCF-II投与群は非投与群と比較して、体重10g当たりの肝重量比、総蛋白濃度及びアルブミン濃度において、有意に上昇していた。このことから、TCF-IIの移植肝の機能改善、再生促進効果が確認された。

#### 【0023】

##### 【実施例5】

##### 異系同部分肝移植における効果

Lewis系ラット(雄、体重262~328g)の肝臓の左葉及び尾状葉を切除後、UW液(ビラスパン(登録商標)液、藤沢薬品社)に1時間冷蔵保存し、これをドナー肝とした。このドナー肝を、肝臓を全摘出した18匹のレシビエントラット(BN系、雄、体重262~338g)に同所性に移植した。尚、この時のドナーとレシビエントの体重差は10g以内とした。このレシビエントラットを各9匹ずつ、TCF-II投与及び非投与群に分けた。TCF-II投与群は、実施例2で得られたTCF-IIをクエ

ン酸緩衝液中に懸濁したものを、移植直後から12時間毎に500 $\mu$ g/kgを1週間静注した。術後3及び7日目に、尾静脈より採血し血清を分離した。分離した血清を用い、常法により総蛋白濃度、アルブミン濃度、GOT、及びGPTの測定を行った。結果を表1~4に示す。

#### 【0024】

##### 【表1】

(血清総蛋白濃度)

TCF	3日目 (g/dl)	7日目 (g/dl)
投与群	5.78 $\pm$ 0.32	5.74 $\pm$ 0.60
非投与群	5.69 $\pm$ 0.22	5.30 $\pm$ 0.27

#### 【0025】

##### 【表2】

(血清アルブミン濃度)

TCF	3日目 (g/dl)	7日目 (g/dl)
投与群	3.87 $\pm$ 0.23	3.98 $\pm$ 0.41 **
非投与群	3.70 $\pm$ 0.17	3.50 $\pm$ 0.16

(\*\* : p<0.01)

#### 【0026】

##### 【表3】

(GOT)

TCF	3日目 (IU/L)	7日目 (IU/L)
投与群	119.0 $\pm$ 19.9 **	447.4 $\pm$ 241.6
非投与群	152.6 $\pm$ 18.7	605.9 $\pm$ 109.7

(\*\* : p<0.01)

#### 【0027】

##### 【表4】

(GPT)

TCF	3日目 (IU/L)	7日目 (IU/L)
投与群	52.1 $\pm$ 9.0	167.6 $\pm$ 96.5 *
非投与群	56.7 $\pm$ 8.2	258.1 $\pm$ 55.9

(\* : p<0.05)

【0028】この結果、TCF-II投与群は、非投与群と比較して総蛋白濃度及びアルブミン濃度が高く、又、GOT及びGPTの上昇が抑制された。このことから、TCF-IIによる蛋白合成能促進及び細胞拒絶反応に伴う肝炎抑制効果、即ち移植肝の機能改善、再生促進効果が確認された。

#### 【0029】

##### 【実施例6】

##### TCF-II処理ドナーの肝移植における効果

##### (1) ドナー肝の準備

Lewis系ラット(雄、体重約300g)に、移植1週間前より実施例2で得られたTCF-IIを500 $\mu$ g/kgを112

回投与した。1週間後に肝臓を30%摘出し、UW液（ビ  
アスパン（登録商標）液、藤沢薬品社）に1時間冷蔵保  
存し、これをドナー肝とした。

## (2) 部分肝移植

実施例6-(1)で得られたドナー肝を、肝臓を全摘出  
した2匹のレシビエントラット（Lewis系、雄、体重約3  
00g）に同所性に移植した。尚、この時のドナーとレシビ  
エントの体重差は10g以内とした。又、TCF-II処理  
していないドナー肝を、TCF-II処理したものと同様  
に30%部分移植した同系のラット（3匹）を対照群とし  
た。各群の移植後からの生存日数を指標とした。結果を  
表5に示す。

【0030】

【表5】

TCF		生存日数 (日)
処理群	No. 1	> 7
	No. 2	> 7
未処理群	No. 1	3
	No. 2	1
	No. 3	0

【0031】この結果、TCF-II処理肝レシビエント  
群は、未処理肝レシビエント群と比較して有意に生存日  
数が延長された。

【0032】

	I 群	II 群	III 群
総蛋白濃度 (g/dl)	7.03±0.24*	5.53±0.41*	4.52±0.19*
アルブミン濃度 (g/dl)	4.47±0.33*	3.19±0.24*	2.52±0.31*
GOT (IU/L)	92 ± 10*	123 ± 22*	698 ± 322*
GPT (IU/L)	21 ± 2*	28 ± 3*	220 ± 51*

\*: 添字が異なる群間で有意差あり (p<0.01)

【0034】この結果、I群及びII群はいずれにおいて  
もIII群と比較して、総蛋白濃度及びアルブミン濃度が  
上昇し、GOT及びGPTの上昇が抑制された。また、  
その程度はI群でより大きかった。このことから、肝移  
植後の免疫抑制剤投与時にTCF-IIを併用投与するこ  
とにより、蛋白合成能促進及び細胞性拒絶反応に伴う肝  
炎抑制効果、即ち移植肝の機能改善、再生促進効果が増  
強することが確認された。

【0035】

【発明の効果】以上の結果より、本発明により、肝細胞  
増殖因子を有効成分とする移植肝機能改善・再生促進  
剤、及び肝細胞増殖因子と免疫抑制剤とを併用した移植  
肝機能改善・再生促進剤が提供される。本発明における  
肝細胞増殖因子としては、特にTCF-IIが好ましい。  
本発明により、移植した肝組織の機能改善及び再生が促  
進され、肝移植手術後の肝機能を早期に回復することが  
できる。

## 【実施例7】

### 異系間部分肝移植時におけるTCF-IIと免疫抑制剤と の併用効果

Lewis系ラット（雄、体重250~286g）の肝臓の左葉及  
び尾状葉を切除後、UW液（ビアスパン（登録商標）  
液、藤沢薬品社）に1時間冷蔵保存し、これをドナー肝  
とした。このドナー肝を、肝臓を全摘出した30匹のレシ  
ビエントラット（BN系、雄、体重244~282g）に同所  
性に移植した。尚、この時のドナーとレシビエントの体  
重差は10g以内とした。このレシビエントラットを各10  
匹づつ、TCF-II+タクロリムス水和物（プログラフ  
（登録商標）、藤沢薬品社）投与群（I群）、タクロリ  
ムス水和物単投与群（II群）、及び非投与群（III群）  
に分けた。I群及びII群に、タクロリムス水和物を移植  
直後から24時間毎に500μg/kgを1週間筋注し、I群  
は、さらに実施例2で得られたTCF-IIをクエン酸緩  
衝液中に懸濁したものを、移植直後から12時間毎に500  
μg/kgを1週間静注した。術後7日目に、犠牲死させ、  
血清の採取を行った。採取した血清は、常法により総蛋  
白濃度、血中アルブミン濃度、GOT、及びGPTの測  
定を行った。結果を表6に示す。

【0033】

【表6】

## 【図面の簡単な説明】

【図1】実施例4のTCF-II投与群(TCF)及び非投与  
群(CUNT)における、10g当たりの肝重量の比較を示す。

## 【符号の説明】

\* P<0.05で有意差あり

\*\* P<0.01で有意差あり

【図2】実施例4のTCF-II投与群(TCF)及び非投与  
群(CUNT)における、血清総蛋白濃度の比較を示す。

## 【符号の説明】

\* P<0.05で有意差あり

\*\* P<0.01で有意差あり

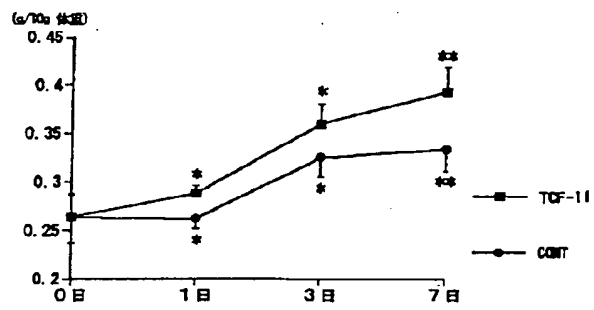
【図3】実施例4のTCF-II投与群(TCF)及び非投与  
群(CUNT)における、血清アルブミン濃度の比較を示す。

## 【符号の説明】

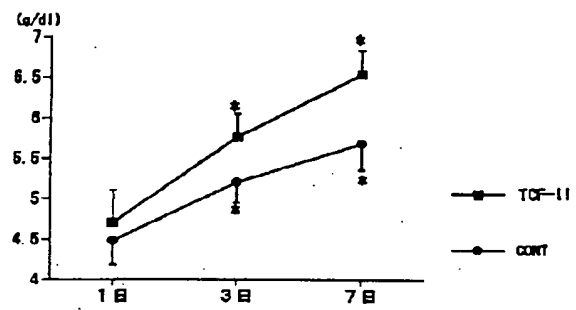
\* P<0.05で有意差あり

\*\* P<0.01で有意差あり

【図1】



【図2】



【図3】

